

УДК 543.635.24:616.15-006

СВОБОДНЫЕ ОЛИГОСАХАРИДЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ ИСТИННОЙ ПОЛИЦИТЕМИЕЙ: ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЩЕГО СПЕКТРА

И.Ю. Письменецкая

ГУ "Днепропетровская медицинская академия", Днепропетровск, Украина

В данной работе впервые были получены хроматографические спектры свободных олигосахаридов плазмы крови больных истинной полицитемией (эритремией) и проведено их сравнение с хроматографическими спектрами гликанов плазмы относительно здоровых доноров. Гликаны разделяли методом нормальнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. В образцах плазмы больных было установлено существенное возрастание концентрации или появление новых структур олигосахаридов, состоящих из 7-9 моносахаридных остатков. Кроме того, были выявлены новые минорные компоненты.

Ключевые слова: свободные олигосахариды, ВЭЖ-спектры, плазма крови человека, истинная полицитемия.

Введение

Свободные олигосахариды - это не связанные с гликоконъюгатами аналоги их углеводных компонентов. Свободные олигосахариды появляются в клетках в ходе метаболизма гликоконъюгатов (гликопротеинов, гликолипидов, протеогликанов и гликозилфосфотидилинозитольных якорей). Наиболее изученными являются пути их образования на начальных этапах N-гликозилирования белков, а также при лизосомальном расщеплении гликоконъюгатов.

N-гликозилирование белков протекает в двух компартментах клетки - в эндоплазматическом ретикулуме и в аппарате Гольджи. С точки зрения образования свободных олигосахаридов, этот процесс можно разделить на несколько этапов: 1) начало синтеза гликана-предшественника на цитозольной стороне эндоплазматического ретикулума [7]; 2) окончание синтеза гликана-предшественника на внутренней стороне мембраны эндоплазматического ретикулума и перенос гликана на синтезирующуюся полипептидную цепь [9]; 3) фолдинг гликопротеина и его клеточный контроль [10]; 4) ассоциированная с эндоплазматическим ретикулумом деградация белков, не прошедших контроль фолдинга [11]; 5) ретроградная деградация аберрантных белков, по тем или иным причинам избежавших первичного контроля фолдинга в эндоплазматическом ретикулуме, из аппарата Гольджи в предыдущий компартмент для последующей деградации [12]. Каждый из этих процессов сопровождается появлением свободных олигосахаридов либо в результате их отщепления от долихоллосфата - липида, на котором синтезируется гликан-предшественник, либо от полипептидной цепи. Большая часть свободных гликанов оказывается в цитоплазме, где начинается их деградация под действием специфических цитоплазматических ферментов [13]. Продолжение этой деградации с расщеплением гликанов до моносахаридов осуществляется лизосомальными ферментами [8]. В лизосомы также поступают зрелые гликоконъюгаты в ходе естественного обмена, где расщепляется как их углеводная часть, так и белковая или липидная [18]. Могут ли образовываться свободные олигосахариды в аппарате Гольджи в ходе синтеза комплексных и гибридных гликанов, пока неизвестно.

Особый интерес представляют свободные олигосахариды, возникающие при ассоциированной с эндоплазматическим ретикулумом деградации. Они могут содержать гликаны с измененной структурой и появляются в клетке раньше, чем гликопротеин с этим аберрантным гликаном окажется в месте функциональной активности (на поверхности клеток, в межклеточном пространстве

или в биологических жидкостях). В норме этому препятствуют механизмы клеточного контроля фолдинга, которые нарушаются при стрессе эндоплазматического ретикулума, т.е. при различных заболеваниях, в том числе и онкологических [17].

Интенсивно изучаются свободные олигосахариды внутри клетки, но мало что известно о содержании этих веществ в биологических жидкостях, а тем более об их изменении при различных состояниях организма человека. Поэтому в данной работе была поставлена задача исследовать свободные олигосахариды плазмы крови больных одним из видов онкотрансформации кроветворной системы - истинной полицитемией - и сравнить их с гликанами плазмы относительно здоровых доноров.

Истинная полицитемия (эритремия, синдром Вакеза, синдром Вакеза-Ослера) относится к хроническим доброкачественным миелопролиферативным заболеваниям кроветворной ткани с невыясненной этиологией. Для данной патологии характерно увеличение количества эритроцитов, уровня гемоглобина и объема плазмы крови. Число лейкоцитов и тромбоцитов также может повышаться, их избыток накапливается в селезенке, за счет чего возникает спленомегалия. Начальные этапы болезни бессимптомны. На последующих стадиях истинная полицитемия опасна как возникновением кровотечений, так и образованием тромбов в кровеносных сосудах. Это приводит к инсультам и инфарктам миокарда. Болезнь может привести к постэритремическому миелофиброзу (сублейкемическому миелозу) и к развитию острого миелобластного лейкоза [1].

Понимание особенностей заболевания на молекулярном уровне - необходимый этап при поиске ранних маркеров заболеваний и молекулярных мишеней для разработки эффективных специфических лекарственных препаратов.

Материалы и методы

Плазма крови пациентов с первично диагностированной истинной полицитемией (n=10) и относительно здоровых доноров (n=10) была отобрана с согласия обеих групп и в соответствии с требованиями этического комитета в клинике ГУ "Днепропетровская медицинская академия". Возраст относительно здоровых доноров соответствовал возрастной категории больных исследуемой группы и составлял от 41 до 65 лет.

Для нормальнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии использовали реактивы фирмы VWR International, остальные химические реагенты были получены от фирмы Sigma-Aldrich.

Удаление белков плазмы. Депротеинизацию нативной плазмы крови проводили путем осаждения белков 10% трихлоруксусной кислотой с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 3000 оборотах в минуту [2]. Остатки белков удаляли с помощью фильтра с гидрофильной полифлуорэтиленовой мембраной (Millex-LH, 0.45 μm , Millipore Corp., США) в соответствии с методикой [6].

Удаление глюкозы. Моносахариды из плазмы после депротеинизации удаляли адсорбционной хроматографией на пористом графите с использованием колонки PGC (Thermo Electron Corp., Runcorn, UK) на 1 мл (25 мг/мл), как описано в работе [6].

Маркирование олигосахаридов флуоресцентной меткой. Свободные олигосахариды метили 2-аминобензойной (антралиновой) кислотой (Sigma - Poole, Dorset, UK) в соответствии с методикой, приведенной в статье Neville D.C.A. et al. [14]. Меченные гликаны очищали твердофазной экстракцией на колонках Speed SPE Cartridges Amide-2, (Applied Separations, США) [6].

Нормальнофазовая высокоэффективная хроматография (ВЭЖХ). Олигосахариды разделяли методом нормальнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе фирмы Waters (Великобритания) с колонкой 4.6x250-mm TSK gel-Amide 80 (Anachem, Luton, Beds, Великобритания) в соответствии с методикой, приведенной в работах Neville D.C.A. et al. [14, 15]. Пики хроматограмм выражали в глюкозных единицах (ГЕ) путем сравнения с хроматограммой внешнего стандарта - частично гидролизованного декстрана, как описано в статье Neville D.C.A. et al. [14].

Компьютерная обработка данных. Для сбора хроматографических данных и их обработки использовали компьютерные программы Waters Millennium, Waters Empower, Peak Time, Microsoft Office Excel 2003/2007, Microsoft Power Point 2003/2007.

Результаты и обсуждение

В данной работе были получены хроматографические спектры свободных олигосахаридов плазмы крови больных истинной полицитемией (эритремией) и проведено их сравнение с хроматографическими спектрами гликанов плазмы относительно здоровых доноров.

Исследовали олигосахариды, состоящие из 4-12 остатков моносахаридов. Поэтому хроматограммы анализировали на отрезке от 20 до 44 минут.

В наших предыдущих работах [3, 4] были изучены спектры гликанов плазмы относительно здоровых доноров и выявлена их высокая стабильность, достаточная для использования этих спектров в качестве контроля. Такой контрольный спектр приведен на рис. 1 (А). Типичные спектры свободных олигосахаридов плазмы крови больных показаны на рис. 1 (В, С, D). Нумерация пиков на всех хроматограммах рисунка указана в соответствии с их нумерацией на контрольном спектре.

Использование частично гидролизованного декстрана в качестве внешнего стандарта, хроматографический спектр которого выделен на каждой хроматограмме пунктиром, позволяет сравнивать результаты, полученные в разных партиях образцов и на разных хроматографах. Кроме того, он дает возможность определить относительную массу углеводов каждого пика в глюкозных единицах. Шкала глюкозных единиц приведена в верхней части рисунка.

Для детальной характеристики молекулярной массы гликанов в таблице 1 приведены глюкозные единицы каждого из 12 указанных на хроматограммах пиков. Нумерация пиков хроматограмм на рисунке и в таблице идентична.

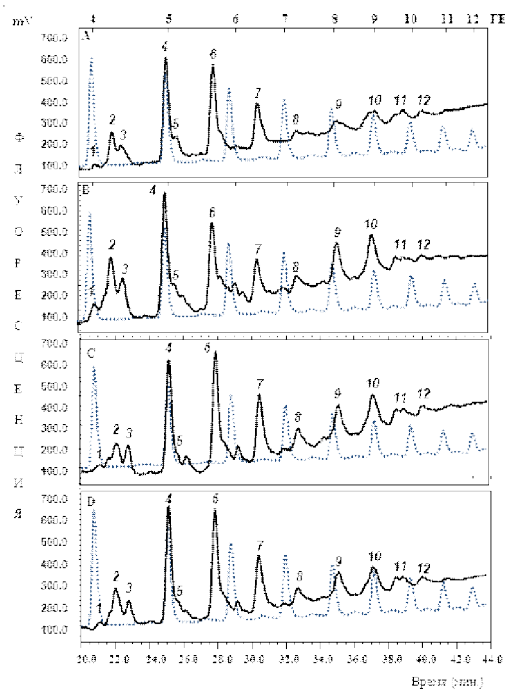


Рисунок 1 - ВЭЖХ-спектры свободных олигосахаридов плазмы крови:
 А - относительно здоровых доноров; В, С, D - больных истинной полицитемией. Пунктиром обозначены спектры частично гидролизованного декстрана

Таблица 1 - Характеристика пиков в глюкозных единицах

№ пика	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ГЕ	4,08	4,28	4,40	5,01	5,17	5,69	6,40	7,08	7,85	8,62	9,40	9,93

ВЭЖХ-спектр свободных олигосахаридов плазмы крови относительно здоровых доноров (рис. 1А) представлен 12 основными пиками и может быть условно разбит на 3 зоны. Первая зона (20-24 мин.) включает 1-й, 2-й и 3-й пики с невысокой концентрацией и относительной молекулярной массой 4,08-4,40 ГЕ. Вторая зона (24-32 мин.) состоит из самых больших пиков спектра - 4-го, 6-го и 7-го с относительной молекулярной массой от 5,01 до 6,40 ГЕ. Третья зона (32-44 мин.) складывается из большого количества слабо выраженных пиков с относительной молекулярной массой 7,08-9,93 ГЕ, среди которых были идентифицированы пики от 8-го до 12-го.

В ВЭЖХ-спектрах свободных олигосахаридов плазмы крови больных истинной полицитемией (эритремией) присутствуют все 12 пиков контрольного спектра. Профили гликанов исследованных образцов могут быть разбиты на такие же условные зоны, как и контрольный спектр. В каждой из этих зон наблюдаются изменения по сравнению с контролем. В первой зоне (20-24 мин.) между первым (4,08 ГЕ) и вторым (4,28 ГЕ) пиками намечается промежуточный пик с относительной молекулярной массой около 4,15 ГЕ, отсутствующий в контрольном спектре. В разных образцах плазмы больных он присутствует всегда, но выражен в разной степени, что отражено на рисунке. Например, на хроматограмме 1С этот пик более четкий, чем на 2-х других хроматограммах. Во второй зоне спектра (24-32 мин.) 4-й, 6-й и 7-й пики сохраняют свое главенствующее положение. Кроме того, между основными пиками второй зоны появляются дополни-

тельные. Так, между 5-м (5, 17 ГЕ) и 6-м (5,69 ГЕ) пиками намечается минорный пик, который четко виден на хроматограмме 1С, а на 1В и 1D выражен слабее. Между 6-м и 7-м (6,40 ГЕ) пиками на хроматограмме 1В появляются 2 минорных пика, а на 2-х остальных хроматограммах - по одному. Особый интерес представляет третья зона (32-44 мин.) ВЭЖХ-спектра свободных олигосахаридов плазмы крови больных, так как именно здесь наблюдаются наибольшие отличия от контрольного спектра. В данном случае эти отличия связаны не с появлением минорных пиков, а с резким возрастанием концентрации 8-го, 9-го и 10-го пиков, которые в контроле только намечаются. Это значит, что увеличивается количество свободных олигосахаридов с относительной молекулярной массой от 7 до 9 ГЕ, т.е. состоящих из 7-9 моносахаридных остатков. Разнообразие возможных структур с таким составом достаточно велико и их определение - сложная задача, требующая дополнительных исследований.

Как было показано в предыдущих работах [4,5], подавляющее большинство гликанов идентифицированных пиков в контрольном спектре соответствуют внутриклеточным свободным олигосахаридам, которые образуются в результате ассоциированной с эндоплазматическим ретикулом деградации. Гликаны 1-го, 3-го, 4-го и 5-го пиков представлены структурами, которые синтезируются на цитозольной стороне эндоплазматического ретикула в ходе N-гликозилирования при сборке гликана-предшественника. Кроме того, в первой и третьей зонах спектра находятся олигосахариды, которые могут возникать при деградации зрелых гликоконъюгатов в лизосомах.

Изменение спектров свободных олигосахаридов плазмы крови больных истинной полицитемией свидетельствует об изменении процессов гликозилирования и деградации гликоконъюгатов при данном заболевании. Следовательно, свободные олигосахариды плазмы крови отражают состояние компартментов клеток, в которых протекают указанные процессы. Повышение общей гетерогенности спектра и появление дополнительных пиков среди гликанов, образующихся в результате деградации, ассоциированной с эндоплазматическим ретикулом, указывают на активацию процесса деградации, что наблюдается при стрессе данного компартмента клетки [17]. Учитывая, что этот тип деградации гликоконъюгатов направлен на разрушение aberrantных молекул до их появления в конечном месте действия, изменение спектра свободных олигосахаридов также должно наблюдаться на самых ранних этапах развития стресса. Поэтому изучение этой группы гликанов обладает особой привлекательностью, как с точки зрения поиска самых ранних маркеров заболеваний, так и с точки зрения прогноза эффективности лечения.

Выводы

1. Впервые были получены ВЭЖХ-спектры свободных олигосахаридов плазмы крови больных истинной полицитемией (эритремией).

2. Показано, что ВЭЖХ-спектры свободных олигосахаридов плазмы больных отличаются от спектров гликанов плазмы относительно здоровых волонтеров более высокой гетерогенностью и появлением четко выраженных, с высокой концентрацией, пиков, которые соответствуют олигосахаридам, состоящим из 7-9 моносахаридных остатков.

3. Свободные олигосахариды плазмы крови отражают изменение состояния эндоплазматического ретикула клеток организма и после проведения более глубо-

ких исследований по их идентификации могут быть полезны для определения этого состояния.

Заключение

Анализ полученных данных показывает, что при истинной полицитемии наблюдаются изменения в хроматографическом спектре свободных олигосахаридов плазмы крови. Используемый метод анализа - нормаль-нофазовая высокоэффективная жидкостная хроматография - позволяет выявить эти изменения. Для практического использования результатов в будущем необходимо более детальное изучение спектра гликанов для определения углеводных структур, образующих пики. Кроме того, нужны исследования изменений спектров свободных олигосахаридов при других заболеваниях и состояниях организма.

Литература

1. Глузман, Д.Ф., Склярченко Л.М., Надгорная В.А. Опухоли кроветворной и лимфоидной тканей (цитоморфология, иммуноцитохимия, алгоритмы диагностики). ДИА. Киев. - 2008. - С.32-34.
2. Письменецька, І. Вплив іммобілізації та депротейнізації плазми крові на спектр вільних олігосахаридів/І.Ю.Письменецька// Вісник Київського національного університету. Біологія. - 2012, Вип. 60. - С. 27-29.
3. Письменецька, І.Ю. Вільні олігосахариди плазми крові практично здорових донорів /І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс //Ученые записки Таврического национального университета им. В.И.-Вернадского. Серия "Биология, химия". - 2012. -Т.25 (64) , №1. - С.182-187.
4. Письменецька, І.Ю. Прогнозування структур вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів / І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия "Биология, химия". - 2012.-Т.25 (64), №3. - С.158-164.
5. Письменецька, І.Ю. Аналіз зарядженої фракції вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів / І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия "Биология, химия". - 2012.-Т.25 (64), №4. - С.159-165.
6. Alonzi, D.S. Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic- reticulum alpha-glucosidase inhibition / D.S. Alonzi, D.C. Neville, R.H. Lachman [et al.] // Biochem J. - 2008. - Vol.409, №2. - P.571-580.
7. Anelli, T. Protein quality control in the early secretory pathway / T. Anelli, R. Sitia // The EMBO Journal. - 2008. - Vol. 27. - P.315-327.
8. Aronson, N.N. Lysosomal degradation of Asn-linked glycoproteins /Aronson N.N., Kuranda Jr.J., Kuranda M.J.// FASEB J. - 1989. - Vol.3, №14. -P.2615-2622.
9. Benyair, R. Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum / R Benyair, E Ron , G.Z. Lederkremer //Int Rev Cell Mol Biol. - 2011. - Vol. 292. - P.197-280.
10. Braakman, I. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum / I. Braakman, N.J. Balleid //Annu. Rev. Biochem. - 2011. -Vol. 80. - P.71-99.
11. Hoseki, J. Mechanism and components of endoplasmic reticulum associated degradation / J. Hoseki, R. Ushioda, K. Nagata / / J. Biochem. - 2010. - Vol.147, № 1. - P.19-25.
12. Kukushkin, N.V Demonstration that endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins can occur downstream of processing by endomannosidase / N.V.Kukushkin, D.S. Alonzi , R.A. Dwek, T.D. Butters // Biochem J. - 2011.- Vol.438, №1. - P.133-142.
13. Moore, S.E., Bauvy C., and Cordogno, P. Endoplasmic reticulum-to- cytosol transport of free polymannose oligosaccharides in permeabilized HepG2 cells / S.E. Moore, C. Bauvy, P. Cordogno / /EMBO J. - 1995. - Vol.14. - P. 6034-6042.
14. Neville, D.C. Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide

glycanase digestion and anthranilic acid labelling / D.C. Neville, V. Coquard, D.A. Priestman [et al.]. // *Anal Biochem.* - 2004. - V.331. - P.275-282.

15. Neville, D.C. Development of a single column method for the separation of lipid- and protein-derived oligosaccharides / D.C. Neville, R.A. Dwek, T.D. Butters // *J. Proteome Res.* - 2009. - Vol.8. - P.681-687.

16. Parodi, A.J. Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation / A.J.Parodi // *Biochem J.* - 2000. - Vol. 348. - P.1-13.

17. Tsai, Y.Ch. The unfolded protein response, degradation from the endoplasmic reticulum, and cancer /Y. Ch. Tsai and A. M. Weissman // *Genes & Cancer.* - 2010. - Vol.1, №7. - P. 764-778.

18. Winchester, B. Lysosomal metabolism of glycoproteins / B. Winchester // *Glycobiology.* - 2005. - Vol.15, № 6. - P.1R - 15R.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена при поддержке международного гранта EMBO (ASTF201-2010) и Института гликобиологии Оксфордского университета (г.Оксфорд, Великобритания) в лаборатории доктора Терри Д. Баттерса (Terry D.Butters).

FREE OLIGOSACCHARIDES IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH POLYCYTHAEMIA VERA: GENERAL PROFILE CHARACTERISTICS

I. Yu. Pismenetskaya

State Institution "Dnepropetrovsk Medical Academy", Dnepropetrovsk, Ukraine

In this work for the first time the chromatographic spectra of plasma free oligosaccharides of patients with polycythaemia vera (erythremia) were obtained and compared with those of practically healthy donors. The glycans were separated with normal phase high-performance liquid chromatography. The plasma samples of the patients were found to have a significant increase in the concentration of oligosaccharides consisting of 7-9 monosaccharides or appearance of new species of these structures. In addition, some new minor components were revealed.

Key words: *free oligosaccharides, HPLC-profiles, human blood plasma, polycythaemia vera.*

Адрес для корреспонденции: e-mail: pirina2004@list.ru

Поступила 21.02.2013